



KONGERIGET DANMARK

PATENT NR. 152763

Patentdirektoratet har i medfør af patentloven af 20. december 1967, som senest ændret ved lov nr. 110 af 11. marts 1986, meddelt patent på den opfindelse, som er angivet i vedlagte patentskrift. Oplysning om patenthaver, og om dagen for bekendtgørelse om patentets meddelelse og om den dag, fra hvilken patenttiden løber, findes på patentskriftets første side.

Patentdirektoratet
24 okt 1988

Per Lund Thoft
Direktør

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(48) Bkg. om patentets
meddelelse

24 OKT. 1988

(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 152763 B

(21) Patentansøgning nr.: 4167/84

(51) Int.Cl.⁴ C 12 N 11/00

(22) Indleveringsdag: 31 aug 1984

C 12 P 7/64

(41) Alm. tilgængelig: 06 mar 1985

(44) Fremlagt: 09 maj 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 05 sep 1983 DK 4025/83

(71) Ansøger: *NOVO INDUSTRI A/S; Patent- og Varemærkeafdelingen; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Peter *Elgtved; DK

(74) Fuldmægtig: -

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret lipasepræparat

(56) Fremdragne publikationer

EP B1 35883
DE pat. nr. 2805950
DE off.g.skrift nr. 2905671
US pat. nr. 4170696
Andre Publikationer : Appl. Microbiol. Biotechnol.,
17 (april 1983), s 107-112

(57) Sammendrag:

4167-84

Fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret
lipasepræparat og anvendelse deraf.

Fremgangsmåden til fremstilling af det
immobiliserede lipasepræparat består i, at man bringer en
vandig opløsning af en mikrobiel lipase i kontakt med en
svag anionbytter under overholdelse af særlige værdier for
pH og kontakttid, hvorefter præparatet isoleres og tørres.
Præparatet kan anvendes til kontinuerlig æmsterificering af
fedtstoffer uden anvendelse af opløsningsmidler eller andre
dyre hjælpestoffer, samt til hydrolyse og syntese af
fedtstoffer.

DK 152763 B

NZAS-0033184

Immobiliserede lipasepræparater til omestring af fedtstoffer er kendt. Således beskrives i dansk patentansøgning nr. 563/77 (svarende til US patentskrift nr. 4.275.081) et immobiliseret lipasepræparat, hvor lipasen

5 fremstilles ved fermentering af arter tilhørende slægterne Rhizopus, Geotrichum eller Aspergillus, og hvor lipasen er bundet på en indifferent, partikelformet bærer, som kan være diatomjord eller alumina, og som udviser et meget stort specifikt overfladeareal. Man har anset det for at være

10 nødvendigt for at anvende et immobiliseret lipasepræparat med et meget stort specifikt overfladeareal (d.v.s. små og porøse bærerpartikler) for at opnå den nødvendige store enzymatiske aktivitet. Med dette immobiliserede lipasepræparat kan man gennemføre omestring diskontinuerligt uden noget

15 opløsningsmiddel; dog kan man med dette immobiliserede lipasepræparat ikke gennemføre en kontinuerlig omestring i en søjle i industriel målestok uden tilstedeværelsen af et opløsningsmiddel, som senere må fjernes, hvilket skyldes det før angivne forhold, at præparatet består af små partikler,

20 som under søjledrift ville frembringe et uacceptabelt højt trykfald. Det fremgår også af en publikation, som blev præsenteret ved Enz.Eng. 6, Kashikojima, Japan, 20. - 25. september 1981 og af artiklen i European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, nr. 14, side 1 - 5 (1982), at

25 et immobiliseret lipasepræparat omfattende lipase fra Rhizopus delemar og en stærk anionbytter (med quaternære aminogrupeer) kan anvendes til omestring med n-hexan som opløsningsmiddel. Enzymudbyttet var dog i henhold til disse referencer meget lavt. I europæisk patentansøgning, der er offentliggjort med

30 publikationsnummeret 0069599, er der beskrevet en enzymatisk omlejring af fedt, hvorved man anvender en lipase fra Aspergillus-arter, Rhizopus-arter, Mucor javanicus eller Mucor miehei som omestringsenzym. Enzymet er understøttet på en bærer, f.eks. Celite. I alle eksemplerne i denne europæiske

35 patentansøgning, som relaterer til kontinuerlig omestring i en søjle, er der anvendt et opløsningsmiddel.

I kendte processer anvender man således opløsningsmidlet for at sænke viskositeten af det fedtholdige udgangsmateriale for at sikre en søjledrift, der er så glat som mulig. Det har hidtil været anset for praktisk talt at
5 være umuligt at undgå opløsningsmidler ved disse kontinuerlige omestringsprocesser i industriel skala p.g.a. det høje tryktab i søjlen, selvom de tekniske fordele, som er knyttet til elimineringen af opløsningsmiddel fra disse omestringsprocesser, er indlysende.

- 10 I europæisk patentansøgning publiceret som nr. 35.883 beskrives, at man kan fremstille et immobiliseret lipasepræparat tiltænkt til omestring af fedtstoffer ved at kontakte en vandig opløsning af mikrobiel lipase med en partikelformet, indifferent bærer, efterfulgt af tørring. Det
15 således fremstillede, immobiliserede lipasepræparat kan anvendes til omestring af fedtstoffer, men kun hvis fedtstofferne er blandet med de relativt dyre, lavere alkylestre af fedtsyrer, f.eks. methylpalmitat, hvilke anvendes som hjælpemidler for at undgå opløsningsmidler; i modsat fald
20 opstår der opløseligheds- og viskositetsproblemer.

Opfindelsens formål er således at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret lipasepræparat, som vil muliggøre en i økonomisk henseende attraktiv gennemførelse af den kontinuerlige omestring uden noget
25 opløsningsmiddel eller andet dyrt hjælpemiddel.

Det har overraskende ifølge opfindelsen vist sig, at en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret lipasepræparat, som kan gennemføres meget let, nemlig ved simpel blanding af en vandig opløsning af lipase og anion-
30 bytter, og som omfatter en specifik kombination af en specificeret kategori af ionbyttere og et specificeret vandindhold i det sluttelige immobiliserede lipasepræparat, åbner mulighed for på en i økonomisk henseende attraktiv måde at gennemføre den kontinuerlige omestring uden noget opløsningsmiddel eller
35 andet dyrt hjælpemiddel.

Fremgangsmåden til fremstilling af det immobiliserede lipasepræparat ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 1 angivne.

- Det beskrives generelt i tysk offentliggjort
- 5 patentansøgning nr. 2 905 671 og nr. 2 805 950, japansk offentliggjort patentansøgning nr. 54-76892 og nr. 57-152886, US patentskrift nr. 4 170 696 og Chem.Abs. bind 82, 27819d, at enzymer, herunder lipaser, kan immobiliseres ved hjælp af partikelformede anionbyttere. For det første foreligger der
- 10 imidlertid ikke nogen universel immobiliseringsmetode, som er velegnet til alle enzymer og alle substrater, idet en specifik immobiliseringsmetode skal udformes for ethvert specifikt enzym og ethvert specifikt substrat, som enzymet skal påvirke. For det andet er lipaserne helt ekstraordinære enzymer i den
- 15 forstand, at den enzymatiske aktivitet udspiller sig på en mellemløbetid mellem to faser, hvilket betyder, at immobiliseringen af lipaserne er et meget intrikat problem, som i høj grad begrænser anvendeligheden af kendte immobiliseringsmetoder på det område, som omfatter
- 20 lipaseimmobilisering, jfr. J. Lavayre et al., Preparation and Properties of Immobilized Lipases, Biotechnology and Bioengineering, bind XXIV, side 1007 - 1013 (1982), John Wiley & Sons. For det tredje er kombinationen af lipase og partikelformet, makroporøs, svag anionbytter ikke beskrevet i
- 25 nogen af de referencer, som er anført i begyndelsen af dette afsnit, og langt mindre er det beskrevet, at denne nye kombination giver anledning til fremkomsten af den overraskende tekniske virkning hvad angår kontinuerlig omestring uden opløsningsmiddel eller andre dyre hjælpemidler.
- 30 Det fremgår også af en artikel af Yoshiharu Kimura et al., "Application of Immobilized Lipase to Hydrolysis of Triacylglyceride" i Eur.J.Appl.Microbiol.Biotechnol. (1983) 17:107-112, at man har anvendt et lipasepræparat, som er immobiliseret på en anionbytter, til hydrolyse af fedtstoffer.
- 35 Det kendte lipasepræparat var således ikke tørret, og det fremgår endvidere af artiklen, at aktivitetsudbyttet er under

18, jfr. tabel I på side 109, således at der ikke har været nogen tilskyndelse til at fortsætte ad denne vej.

Det har vist sig, at temperaturen ikke har nogen stor virkning på aktivitetssudbyttet, idet det eksperimentelt har vist sig, at aktivitetssudbyttet er praktisk taget temperaturafhængigt, når temperaturen under immobilisering holdes mellem 5 og 35°C.

For ikke at inaktivere enzymet gennemføres de kendte omestninger ved relativt lav temperatur. Dette muliggøres p.g.a. tilstedeværelsen af opløsningsmidlet, som er i stand til at opløse fedtstoffet, der kan have et relativt højt smeltepunkt. Det har overraskende vist sig, at det immobiliserede lipasepræparat fremstillet under anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen har en tilstrækkelig god stabilitet i det smeltede fedt, der har en relativt højere temperatur. Trykfaldet gennem den omestringssøjle, der er ladet med det immobiliserede lipasepræparat fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er også tilstrækkelig lavt til at muliggøre en problemfri drift. Det har også overraskende vist sig, at den enestående kombination af kontaktbetingelser, ionbytter og vandindhold frembringer en høj specifik lipaseaktivitet i den smeltede fedtblanding i modsætning til alle tidligere forsøg på at tilvejebringe et immobiliseret lipasepræparat, i forbindelse med hvilke det var hensigten, at det skulle anvendes uden noget opløsningsmiddel. Hvorimod hidtil kendte processer af den art, der er beskrevet i dansk patentansøgning nr. 563/77, har krævet en rensset lipase for at tilvejebringe et anvendeligt, immobiliseret præparat, har det yderligere overraskende vist sig, at det immobiliserede lipasepræparat fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan fremstilles på basis af et temmeligt urent lipaseprodukt. Medens præparatet svarende til de hidtil kendte processer af den art, der er beskrevet i dansk patentansøgning nr. 563/77, har involveret anvendelsen af et organisk opløsningsmiddel for at udfælde lipasen på bæreren, kan det også anføres, at intet sådant organisk opløsningsmiddel er nødvendigt til fremstilling af det immo-

biliserede lipasepræparat ifølge opfindelsen, hvilket kan fremstilles meget let blot ved at blande bæreren med en vandig lipaseopløsning. Medens lipaseaktiviteten relativt let vaskes bort eller på anden måde fjernes fra det kendte præparat af den art, der er beskrevet i dansk patentansøgning nr. 563/77, har det yderligere vist sig, at det er praktisk taget umuligt at fjerne lipasen i det immobiliserede lipasepræparat fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fra præparatet, medmindre den udsættes for ekstreme kemiske eller fysiske behandlinger, f.eks. ekstreme pH- og temperaturbetingelser. Det har endelig vist sig, at det immobiliserede lipasepræparat fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan fremstilles med et højt enzymudbytte, hvilket muliggør en billigere kontinuerlig omestring end de kendte omestring.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af det immobiliserede lipasepræparat er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 2 angivne. Herved muliggøres en højere omestringstemperatur og dermed en højere produktivitet. Yderligere er det ved hjælp af denne udførelsesform muligt at fremstille et immobiliseret lipasepræparat, som er velegnet til omestring af højere smeltende fedtstoffer.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af det immobiliserede lipasepræparat er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 3 angivne. *Mucor miehei* er en god producent af 1,3-specifik lipase, og man kan således herved opnå et billigt produkt.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af det immobiliserede lipasepræparat er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 4 angivne. På denne måde tilvejebringes der tilstrækkelig lipase til ionbytteren.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af det immobiliserede lipasepræparat er ejendommelig ved det i den kendetegnende del

af krav 5 angivne. På denne måde sikres der en stærk binding mellem lipase og ionbytter samt en god stabilitet og aktivitet.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden 5 ifølge opfindelsen til fremstilling af det immobiliserede lipasepræparat er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 6 angivne. På denne måde approksimeres eller opnås en tilstand af lipasemætning.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden 10 ifølge opfindelsen til fremstilling af det immobiliserede lipasepræparat er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 7 angivne. Denne fremgangsmåde er simpel og kan let tilpasses til industriel praksis.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden 15 ifølge opfindelsen til fremstilling af det immobiliserede lipasepræparat er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 8 angivne. Tørretrinnet kan gennemføres i vacuum, i fluidiseret masse eller under anvendelse af andre tørremetoder, som er velegnet til stordrift. Herved opnås et 20 slutteligt lipasepræparat med en høj omeststringsaktivitet.

Opfindelsen skal nu illustreres ved de følgende eksempler.

Den Mucor miehei lipase, som anvendes i de følgende eksempler, kan rekvireres fra NOVO Industri A/S, Novo Alle, 25 2880 Bagsværd, Danmark (som enzymprodukt SP 225). Denne Mucor miehei lipase kan fremstilles som angivet i dansk patentansøgning nr. 4234/77.

Den lipaseaktivitetsenhed (LU), som er angivet i eksemplerne, bestemmes som beskrevet i publikationen AF 30 95.1/2-GB af 83-01-03, som er rekvirerbar fra NOVO Industri A/S, Novo Alle, 2880 Bagsværd, Danmark.

Omeststringsaktiviteten af de immobiliserede lipasepræparater bestemmes ved hjælp af en batchprøve baseret på følgende reaktioner:

OOO + P POO + O
 POO + P POP + O,

hvor O = oliesyre, P = palmitinsyre, og OOO, POO og POP er fedtstoffer, der indeholder de angivne fedtsyrer i den angivne rækkefølge, hvorved OOO således er triolein.

250 mg immobiliseret lipasepræparat blandes med 600 mg triolein (0,68 mmol) og 174 mg palmitinsyre (0,68 mmol) opløst i 12 ml petroleumsether (temperatur 80 - 100°C) i et 20 ml reagensglas med skruelåg. Rørene inkuberes i et vandbad ved 40°C og rystes i 1/2, 1 eller 3 timer.

Reaktionsblandingen afkøles, filtreres og fordampes. Den relative mængde af OOO, POO og POP bestemmes ved HPLC, og procentdelen af inkorporeret P beregnes som

$$15 \quad \% \text{ inkorporeret P} = \frac{\% \text{ POO} + 2 \times \% \text{ POP}}{3}$$

Ligevægtsblandingen af den før beskrevne reaktionsblanding hidrørende fra den diskontinuerlige reaktion er ca. 43% POO og 10% POP eller 21% inkorporeret P.

- 20 I nogle af de følgende eksempler gennemføres omestringen som en batch-proces med eller uden opløsningsmiddel. På basis af sammenligningsforsøg har det vist sig, at et immobiliseret lipasepræparat, som har tilfredsstillende omeststringsaktivitet og -stabilitet, i henhold til batch-
- 25 omeststringsprøven, og som udviser en partikelstørrelsesfordeling og en fysisk styrke, der er velegnet til tilfredsstillende søjledrift, vil arbejde tilfredsstillende under kontinuerlig drift i en søjle, med eller uden opløsningsmiddel. En tilfredsstillende batch-prøve under disse
- 30 omstændigheder er således bevis for, at man kan gennemføre en tilfredsstillende kontinuerlig søjleprøve med det pågældende immobiliserede lipasepræparat.

Eksempel 1

Dette eksempel illustrerer virkningen af pH under adsorption af Mucor miehei lipase på omeststringsaktiviteten.

2,0 g Mucor miehei lipase, 93.000 LU/g, blev opløst i 20 ml vand, og 10 g med vand vasket Duolite® ES 562 anionbytter, tørvægt 8,5 g, blev suspenderet heri.

pH i tre portioner af denne art blev indstillet på henholdsvis 5,0, 6,0 og 7,0, og man overlod portionerne til sig selv med magnetisk omrøring i 4 timer ved ca. 5°C.

De tre portioner blev filtreret. Efter filtrering var mængden af hydrolytisk aktivitet (LU) i de tre filtrater (før vask) mellem 10 og 17% af de totale, initiale mængder (186.000 LU). Derpå gennemførte man en vandvask med en lille mængde vand, og derefter blev præparaterne tørret natten over i vacuum ved stuetemperatur.

Resultaterne er sammenstillet i den følgende tabel.

Immobilisering pH	Udbytte g	Vandindhold, %	Omeststringsaktivitet, 30 minutter		
			% POO	% POP	% inkorporeret P
5,0	9,20	9,5	24,5	6,2	12,3
6,0	9,56	8,2	26,5	6,6	13,2
7,0	9,41	8,0	21,2	5,2	10,5

25 Eksempel 2

Tre 10 g portioner af fugtig ionbytter Duolite® ES 562 (tørvægt 8,35 g) blev suspenderet i 50 ml vand, og der tilsættes 4 N NaOH, indtil pH stabiliseredes ved 6,0. Derpå blev de vasket med rigelige vandmængder, og man lod vandet løbe fra på en Büchner-tragt, hvorved den drænede vægt var ca. 16 g.

Til hver af to 10 g portioner tilsættes en opløsning af 2,5 g Mucor miehei lipase (aktivitet 93.000 LU/g) i 25 ml vand, og pH blev indstillet på 6,0.

Til den tredje portion tilsættes en opløsning af 2,5 g af den ovenfor angivne Mucor miehei lipase i 50 ml vand, og pH blev indstillet på 6,0.

Blandingen blev langsomt omrørt ved stuetemperatur (25°C) i to timer. Herefter blev væsken filtreret fra på en Büchner-tragt.

En af portionerne med 25 ml lipaseopløsning blev 5 yderligere vasket med 2 x 25 ml vand. De immobiliserede præparater blev tørret i vacuum.

Med henblik på omeststringsprøven blev 250 mg (tør-vægt) af de immobiliserede lipasepræparater fugtet med 20 µl vand før blandingen med substratet.

10	Lipasepræparat immobili- seret med	Omestring, 1/2 time		
		% POO	% POP	% inkorporeret P
	2,5 g lipase i 25 ml uden vask	25,8	6,85	13,2
15	2,5 g lipase i 25 ml med vask	30,1	7,65	15,1
	2,5 g lipase i 50 ml uden vask	26,8	6,86	13,5

Dette eksempel viser, at påfølgende vask med vand 20 for at fjerne ubundet lipase er væsentlig med henblik på opnåelse af en høj omeststringsaktivitet, hvorimod mængden af det vand, hvori lipasen er opløst under immobiliseringen, er af mindre betydning.

Eksempel 3

25 50 g fugtig ionbytter Duolite® ES 562 (tørvægt 41,8 g) blev indstillet på pH 6,0 og vasket som i eksempel 2.

10,6 g portioner af denne fugtige ionbytter (5 g tørvægt) blev blandet med forskellige mængder af en 10% opløsning af Mucor miehei lipase (81.000 LU/g) i henhold til 30 tabellen.

Efter reaktionen blev væsken filtreret fra på en Büchner-tragt, og lipasepræparatet blev vasket med 2 x 25 ml vand og tørret i vacuum til ca. 97% tørstof.

Prøverne af immobiliseret præparat med en tørvægt på 250 mg blev med henblik på analyseformål befugtet med 20 μ l vand før analyse.

	g fugtig 5 ionbyt- ter	g 10% op- løsning af lipase	Reakti- onstid, % timer ved stuetem- peratur	Omestring, 1/2 time % POO % POP % inkorporeret P
10	10,6	12,5	1	26,5 6,62 13,3
	10,6	12,5	2	27,0 6,62 13,4
	10,6	12,5	4	28,2 7,27 14,3
	10,6	25	1	23,5 5,90 11,8
	10,6	25	2	29,7 7,56 14,9
15	10,6	25	4	31,4 7,99 15,8
	10,6	50	1	19,5 4,34 9,4
	10,6	50	4	26,6 6,73 13,4

Dette eksempel viser, at den optimale dosering af lipase afhænger af reaktionstiden.

20 Eksempel 4

To af præparaterne fra eksempel 3 blev genanalyseret med varierende vandtilsætning, nemlig prøven med 12,5 g lipaseopløsning og prøven med 25 g lipaseopløsning, begge med en reaktionstid på 2 timer. Virkningen af fugtighedsindholdet på omestringsaktiviteten fremgår af den følgende tabel.

5 Prøve	μl vand tilsat til 250 mg tør- vægt	% fugtig- hed i prø- ven	Omestring, 1/2 time		
			% POO	% POP	% inkorporeret P
12,5 g	0	2,6	18,2	2,27	7,6
	20	9,6	25,6	6,55	12,9
	50	18,5	23,4	5,85	11,7
	100	29,9	15,3	3,84	7,6
25 g	0	3,0	19,1	2,04	7,7
	20	10,0	28,6	7,65	14,6
	50	18,8	25,4	5,25	12,0
	100	30,1	18,6	4,55	9,2

Dette eksempel viser, at det optimale fugtighedsindhold er ca. 10%.

Eksempel 5

- 20 Et af præparaterne fra eksempel 3 blev genanalyseret med varierende mængder tilsat vand. Man anvendte prøven med 25 g lipaseopløsning og 4 timers reaktionstid.

25 til 233 mg tør- vægt	μl vand tilsat i prø- ven	% vand	Omestring, 1/2 time		
			% POO	% POP	% inkorporeret P
30	0	9,5	28,0	6,57	13,7
	10	13,1	28,9	7,45	14,6
	20	16,2	27,9	6,46	13,6
	30	19,1	26,6	6,96	13,5
	40	21,8	25,0	6,77	12,8
	50	24,4	22,8	5,20	11,1
35	75	30,0	19,6	4,54	9,6
	100	34,9	14,6	3,88	7,5
	150	42,9	0,44	0	0,1

Eksempel 6

22,8 g fugtig ionbytter Duolite® A 561 (88,2% tør-40 vægt) blev indstillet på pH 6,0 og vasket.

En anden 22,8 g prøve af Duolite® A 561 blev delvist knust i en morter før pH-indstillingen og vasken.

Til hver af disse portioner tilsattes en opløsning af 10 g Mucor miehei lipase (93.000 LU/g) i 200 g vand, indstillet på pH 6. Reaktionen foregik i løbet af 2 timer ved stuetemperatur.

De immobiliserede enzymer blev vasket med 1 liter vand og tørret i vacuum.

Efter tørring blev den ikke knuste prøve knust i en morter, og begge prøverne blev sigtet.

Sigtefraktion	Omestring, 1/2 time					
	Knusning før immobiliseringen			Knusning efter immobiliseringen		
	% POO	% POP	% inkorp. P	% POO	% POP	% inkorp. P
180 - 300 µm	30,1	7,78	15,2	25,7	6,39	12,8
425 - 500 µm	25,7	6,66	13,0	21,7	5,50	10,9
600 - 710 µm	19,2	5,06	9,8	17,2	4,38	8,7
850 - 1000 µm	12,7	3,22	6,4	14,3	3,90	7,4

Det fremgår tydeligt, at det med henblik på opnåelsen af maksimal omestringsaktivitet er en fordel at anvende de fine sigtefraktioner, men behovet for et lavt tryktab gør et kompromis nødvendigt.

Eksempel 7

Dette eksempel illustrerer virkningen af forskellige kategorier af makroporøse, svage anionbyttere (type af matrix, funktionelle grupper, partikelstørrelse) på omestringsaktiviteten af det immobiliserede lipasepræparat ved diskontinuerlig omestring.

I forbindelse med Duolite® ES 562, Duolite® A 561, Duolite® A7, Amberlite® IRA 93 og Amberlyst® A blev ionbytterportioner med 4,25 g tørvægt vasket med vand, blandet med 1 g Mucor miehei lipase (93.000 LU/g) i 20 ml vand, hvorved blandingens pH blev indstillet på 6,0, og man omrørte langsomt i 2 timer ved stuetemperatur. Efter filtrering blev hvert præparat vasket med 250 ml vand. I tilfælde af Duolite® A 378

blev 8,5 g blandet med 2 g lipase og slutteligt vasket med 250 ml vand. Alle blev tørret i vacuum ved stuetemperatur. I tilfælde af Duolite® A 365, Duolite® S 578 og Dowex® MWA-1 blandedes en ionbyttermængde svarende til 4,25 g tørvægt med 15 g Mucor miehei lipase (124.000 LU/g) i ca. 10 ml vand i to timer ved rotation ved stuetemperatur (dog anvendtes i tilfælde af Lewatit® 0,5 g lipase). Efter filtrering og vask med 2 volumina vand blev præparaterne tørret i vacuum ved stuetemperatur. Karakterisering af de immobiliserede 10 præparater er vist i den følgende tabel.

	Anionbytter	Matrix	Funktionel- le grupper	Partikel- størrel- ser, μm (85%)	Vand, %	Aktivitet ved dis- kontinuerlig drift, 1/2 time		
						% POO	% POP	% inkorp. P
5	Duolite® ES 562	Phenol- formal- dehyd	Tert.amin	212 - 425	13,8	26,7	6,8	13,4
10	Duolite® A 561	Phenol- formal- dehyd	Tert.amin	300 - 1200	13,0	14,8	3,2	7,1
	Duolite® A 7	Phenol- formal- dehyd	Sekundær amin	300 - 1200	13,5	9,5	2,5	4,8
15	Duolite® A 378	Poly- styre- nisk	Tert.amin	300 - 1100	6,3*	14,3	3,3	7,0
	Amberlite® IRA 93	Styren- DVB	Polyamin	400 - 500	12,2	10,8	2,9	5,5
20	Amberlyst® A 21	Styren- DVB	Tert.amin	425 - 850	11,1	10,6	2,7	5,3
	Duolite® A 365	Polysty- renisk	Prim.amin	300 - 1200	11,5	15,5	3,7	7,6
25	Duolite® S 587	Phenol- form.	Aminer	300 - 1100	7,4	25,4	6,4	12,7
	Lewatit® MP 62	Polysty- renisk	Aminer	300 - 1200	13,6	16,9	3,9	8,2
	Dowex® MWA-1	Styren DVB	Tert. amin	300 - 1200	10,5	21,0	4,9	10,3
30	* 5% vand blev tilsat før analysen							

Eksempel 8

30 g Duolite® ionbytter af typen ES 562 blev suspenderet i ca. 75 ml H_2O , og pH blev indstillet på 6,0 med 4 N NaOH. Ionbytteren blev vasket med vand på et sugefilter, og overskud af vand blev suget bort. Den våde ionbytter (ca. 45 g) blev delt i tre lige store dele.

Den første tredjedel blev blandet med en opløsning af 1 g Mucor miehei lipase (210.000 LU/g) i 20 ml H_2O , hvis pH var indstillet på 6,0. Efter blanding blev pH genindstillet på

6,0, og man lod blandingen reagere i 4 timer ved 5°C under magnetisk omrøring. I dette tidsrum faldt pH til 5,45.

Blandingen blev overført til en Büchner-tragt med nogle få ml vand, og så meget som muligt af opløsningen blev suget bort 5 (14 ml). Ionbytteren blev yderligere tørret i vacuum til et vandindhold af 10,0%. Udbyttet var 8,27 g.

Den anden tredjedel af den våde ionbytter blev blandet med en opløsning af 1 g af den før angivne lipase i 20 ml 0,1 M natriumacetat-stødpude (pH 6,0). Blandingens pH blev 10 genindstillet på 6, og man lod blandingen reagere i 4 timer ved 5°C under magnetisk omrøring. I dette tidsrum faldt pH til 5,83. Den yderligere fremgangsmåde blev gennemført som angivet i relation til den første tredjedel af den våde ionbytter, hvorved der fremkom 21 ml filtrat og 9,10 g tørret præparat 15 med et fugtighedsindhold på 9,5%.

Den tredje tredjedel af ionbytteren blev blandet med lipaseopløsning som før, men pH blev holdt konstant ved 6,0 under den 4 timer lange koblingsperiode ved 5°C ved tilsætning af 0,58 ml 1 N NaOH. Blandingen blev oparbejdet som de andre 20 tredjedele, hvorved der fremkom 28 ml filtrat og 8,95 g tørret præparat med 8,9% fugtighed. De tre filtrater indeholdt mellem 1 og 5% af den initiale, totale aktivitet.

Omeststringsaktiviteten med 250 mg immobiliseret lipasepræparat efter en reaktionstid på 30 minutter ved 40°C 25 fremgår af den følgende tabel.

	Enzympræparat immobiliseret i	Omeststringsaktivitet, 1/2 time		
		% POO	% POP	% inkorporeret P
30	afmineraliseret			
	vand, pH 6	27,4	6,6	13,5
	0,1 M acetat, pH 6	25,4	6,5	12,8
35	afmineraliseret			
	vand, pH-stat ved pH 6	27,7	7,0	13,9

Som det fremgår af tabellen, er der kun små forskelle mellem præparaterne.

Eksempel 9

Dette eksempel illustrerer virkningerne på omestningsaktiviteten af tilstedeværelsen af to salte i koncentrationsintervallet 0 - 0,5 M under immobiliseringen.

5 Fem 1,00 g portioner af Mucor miehei lipase, som er diafiltreret og frysetørret, med en aktivitet af 93.000 LU/g, blev opløst i 20 ml af:

- 1) demineraliseret vand
- 2) 0,05 M natriumphosphat, pH 6,0
- 10 3) 0,5 M - , pH 6,0
- 4) 0,05 M natriumchlorid
- 5) 0,5 M -

Andre fem 5,25 g portioner (tørvægt 4,25 g) af Duolite® ES 562 ionbytter blev ækvilibreret med 20 ml af de
 15 under 1) og 5) i det foregående angivne væsker. Efter dekantering blev de tilsvarende lipaseopløsninger tilsat til de våde ionbytterpartikler, hvis pH var indstillet på 6,0, og beholderne blev holdt under langsom rotation i 2 timer ved 25°C. Præparaterne blev derpå opsamlet ved filtrering, og hver
 20 af dem blev vasket med 250 ml demineraliseret vand efterfulgt af tørring i vacuum ved 25°C (64 timer). Resultaterne af prøverne for omestningsaktiviteten er vist i den følgende tabel:

25	Salt/koncentration	Udbytte (g)	% H ₂ O*	Omestningsaktivitet, 1/2 time		
				% POO	% POP	% inkorp. P
	intet salt	4,51	4,7	23,1	5,7	11,5
	0,05 M phosphat	4,48	5,3	21,9	5,3	10,8
30	0,5 -	4,57	4,6	20,3	5,1	10,2
	0,05 M NaCl	4,54	4,6	23,4	5,7	11,6
	0,5 M -	4,43	4,9	19,2	4,6	9,5

* før prøven blev der tilsat yderligere H₂O op til totalt
 35 10%.

Eksempel 10

Dette eksempel viser virkningerne på præparaternes omestningsaktivitet hidrørende fra store koncentrationer af natriumacetat under lipase-immobiliseringen.

5 Fem 1,00 g portioner af *Mucor miehei* lipase, diafiltreret og frysetørret, 93.000 LU/g, blev separat opløst i 20 ml af følgende væsker:

- 1) afmineraliseret vand
- 2) 0,5 M natriumacetat, pH 6,0
- 10 3) 1,0 M - , pH 6,0
- 4) 2,0 M - , pH 6,0
- 5) 4,0 M - , pH 6,0

Fem 4,25 g (tørvægt) portioner af Duolite® ES 562 ionbytter blev vasket og ækvilibreret ved blanding med de fem
 15 ovenfor angivne væsker 1) - 5) efterfulgt af rystning i 15 minutter. Tilsvarende lipaseopløsniner og vaskede ionbyttere blev blandet, indstillet på pH 6,0 og langsomt roteret i 2 timer ved stuetemperatur. Hvert præparat blev filtreret, vasket med 250 ml vand og tørret i vacuum ved stuetemperatur.
 20 Præparaterne blev analyseret for omestningsaktiviteter ved diskontinuerlig omestning, og resultaterne er vist i den følgende tabel.

	Acetat- koncen- tration (M)	Udbytte efter tørring (g)	Vand efter tørring (%)	Filtrat pH	Akt. (%)*	Omestningsaktivitet ved diskontinuerlig omestning, 1/2 time		
						% POO	% POP	% inkorporeret P
	0	4,81	7,8	5,2	51	22,2	5,7	11,2
	0,5	4,67	8,0	5,8	64	20,1	4,7	9,8
30	1,0	4,72	9,6	5,8	71	18,8	4,3	9,1
	2,0	4,73	9,1	5,8	55	27,9	7,3	14,2
	4,0	4,75	10,4	5,6	69	19,8	4,7	9,7

*) Aktivitet i procent af den totale, initiale mængde (93.000 IU).

Eksempel 11

Dette eksempel illustrerer immobiliseringen af andre mikrobielle lipaser end *Mucor miehei* lipase.

Fusarium oxysporum lipase, fremstillet som beskrevet i dansk patentansøgning nr. 2999/84, eksempel 23, blev immobiliseret ved at blande 6,72 g lipase med 88.000 LU/g og en mængde af Duolite® ES 562 ionbytter svarende til 4,25 g tørstof, vasket og pH-indstillet, i 25 ml vand ved pH 6,0, og ved at rotere ved stuetemperatur i to timer. Man vaskede derpå med 2 x 25 ml vand, og ved vacuumtørring fremkom der 4,93 g præparat med et vandindhold på 8,1%. Den aktivitet, som blev efterladt i den totale filtratmængde, svarede til 18% af den oprindelige aktivitet.

Aspergillus niger esterase fremstilledes ved ultrafiltreringen af det kommercielle produkt Palatase fra NOVO. 15 ml Palatase med 2790 LU/ml blev immobiliseret på 4,25 g ES 562, som beskrevet i det foregående, hvorved der fremkom 4,77 g immobiliseret præparat med 7,6% vand. Filtratet indeholdt 13% af den oprindelige LU-aktivitet.

Candida cylindracea lipase fra Amano (type OF) blev på lignende måde immobiliseret ved at blande 4,25 g ES 562 med 1,40 g Amano lipase OF i 15 ml vand, pH 6,0. Udbyttet var 4,62 g immobiliseret præparat med 6,5% vand, hvorved 0,2% aktivitet forblev i filtratet.

De tre præparater blev karakteriseret på følgende måde:

- 1) ved den standardiserede batch-prøve ved 40°C
- 2) ved en batch-omestring med triolein (OOO)/decansyre (D) uden opløsningsmiddel ved 60°C under anvendelse af 3,00 g OOO, 0,600 g D og 250 mg tørt lipase-præparat hydratiseret til ca. 10% vand.

Af sammenligningsgrunde er også resultaterne for et *Mucor miehei* lipasepræparat, jfr. det i eksempel 13 beskrevne, anført i den følgende tabel:

	Evalueret	000/P/opløsnings-			
Immobiliseret	ladning,	middel, 40°C		000/D, 60°C	
lipase	LU/mg	Tid (h)	%P inkorp.	Tid (h)	%D inkorp.
<hr/>					
Fusarium					
5 oxysporum	11	3	8,0	17	5,9
Aspergillus					
niger	8	3	4,4	17	6,5
Candida					
cylindracea	30	3	8,9	17	1,9
10 Mucor					
miehei	30	0,5	14,7	2	13,2

Der henvises til den følgende tabel med henblik på frembringelse af en bedre oversigt over de foregående eksempler.

Dette eksempel (Disse eksempler) illustrerer virkningen på omestningsaktiviteten af de immobiliserede lipasepræparater fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen hidrørende fra

5

Eksempel No.

	1, 8	pH
	2	påfølgende vask
10	3	lipase-ladning i relation til reaktionstid
	4 - 5	procent vand
	6	partikelstørrelse
	7	ionbyttertype
	8 - 10	ionstyrke
15	11	lipasedannende mikroorganisme

For at påvise anvendeligheden af det immobiliserede lipasepræparat fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendtes et immobiliseret lipasepræparat, der var fremstillet under anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, som senere angivet, ved en kontinuerlig omestning af fedtstoffer uden anvendelse af opløsningsmiddel, som beskrevet i det følgende eksempel 12.

Eksempel 12

Dette eksempel illustrerer kontinuerlig omestning af fedtstoffer uden opløsningsmiddel eller andre dyre hjælpestoffer, under anvendelse af et immobiliseret lipasepræparat

fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen i en reaktor med sammenpakket masse.

Immobilisering

2,20 g Mucor miehei lipase (81.000 LU/g) blev opløst i 20 ml vand, blandet med 10 g vasket (8,5 g tørvægt) Duolite® ES 562 ionbytter, hvori over 80% af partiklerne lå mellem 200 og 400 µm. Blandingen blev indstillet på pH 5,0, og den blev overladt til sig selv i 4 timer ved 5°C under magnetisk omrøring. Efter filtrering og vask med en lille mængde vand blev præparatet tørret i vacuum ved stuetemperatur. Udbyttet var 9,05 g, og vandindholdet var 9,3%. Den aktivitet, som forblev i filtratet, var 8% af den totale, initiale mængde. Omestringsaktiviteten ved diskontinuerlig omestring var 30,6% POO, 7,7% POP ved 1/2 time eller 15,3% inkorporeret P.

15 Forsøg i søjle

2 g af dette immobiliserede lipasepræparat blev indført i en søjle, og et opløsningsmiddelfrit substrat bestående af olivenolie/palmitinsyre i forholdet 2,5:1 w/w blev kontinuerligt ført derigennem ved 60°C. Egenskaberne af lipasepræparatet er vist i den følgende tabel.

Prøve/tid	Strømning, g TG/h/ g enzym	Sammensætning (HPLC)			Konvertering x, % (GLC)
		OOO %	POO %	POP %	
<hr/>					
Oliven-					
25 olie/start	-	42,3	22,5	3,8	0
17 timer	5,7	30,5	30,1	11,6	-
208,5 timer	2,5	33,8	28,8	8,6	28
233 -	0,61	22,2	34,8	16,5	67
475 -	1,8	35,1	28,8	8,7	28
30 Ligevægt (diskon- tinuerlig)	-	17,4	36,0	20,6	100

Symbolfortegnelse TG: Triglycerider; g enz. = gram immobiliseret lipase.

% inkorporeret P er bestemt ved GLC af fedtsyremethylestere.

Konvertering $x = (\% P - \% P_0) / (\% P_{eq} - \% P_0)$. P_0 , P_{eq} er % inkorporeret P i olivenoliesubstratet (P_0) og i TG-blandingen ved ligevægt (P_{eq}).

5 Kommentarer

Baseret på de data, der er angivet i forbindelse med 208 1/2 og 475 timer, viser en ekstrapolering til begyndelsestidspunktet i en semilogaritmisk afbildning en initial aktivitet (strømning) på 3,2 g TG/h/g enzym ved en tilsvarende 10 konverteringsgrad $x = 28\%$. Halveringstiden er bedømt til at være 500 - 600 timer ved 60°C uden opløsningsmiddel og med et forhold olivenolie/P = 2 1/2:1 (w/w). Der forekom ingen trykfaldsproblemer. Et tidligere forsøg på i en søjle at føre et lignende substrat gennem lipase adsorberet på Celite af den 15 art, der er beskrevet i dansk patentansøgning nr. 563/77, var umuligt at gennemføre.

Eksempel 13

Dette eksempel illustrerer en i pilot plant skala gennemført produktion af et immobiliseret lipasepræparat i en 20 søjle og anvendelsen af dette præparat til kontinuerlig omestring i en søjle med substrat ved 60 og 70°C, uden opløsningsmiddel.

Immobilisering

6,0 kg (81% tørstof) Duolite® ES 562 ionbytter blev 25 konditioneret i henhold til fabrikantens information (Duolite® Technical Information 0110A). Denne konditionering omfatter en cyklisk behandling med syre og base og i dette tilfælde også en ethanolskylning (for at sikre maksimal renhed ved fremstilling af næringsmidler). pH blev indstillet til 6,0 i 30 0,1 M acetatstødpude. Suspensionen blev fyldt i en søjle, og

den bundfældede ionbytter (18 l) blev vasket med 72 liter vand.

18 liter Mucor miehei lipase (10.100 LU/ml) indstillet på pH 6,0 blev recirkuleret med en hastighed af 30 l/h i 6 timer under pH-kontrol. Efter fortrængning med 20 liter vand indeholdt et kombineret volumen på 37 liter 126 LU/ml svarende til et immobiliseringsudbytte på 97%. Søjlen blev yderligere vasket med andre 20 liter vand, og præparatet blev vacuumtørret ved stuetemperatur, hvorved der opnåedes 6,0 kg (97% tørstof) immobiliseret lipasepræparat. Omestringsaktiviteten ved diskontinuerlig drift var 30,2% POO, 6,9% POP ved 1/2 times drift eller 14,7% P_{ink}.

Anvendelsesforsøg nr. 1

4,0 g af det immobiliserede lipasepræparat blev fyldt i en med vandkappe forsynet søjle med en indre diameter på 1,5 cm. Temperaturen i søjlen blev holdt på 60°C. Et substrat af olivenolie/decansyre i et forhold 2,5/1 (w/w) blev pumpet gennem en forkolonne med 30 g Duolite® S 561 mættet med 21 ml ionbyttet vand og yderligere gennem hovedsøjlen indeholdende det immobiliserede lipasepræparat. Strømningshastigheden blev kontrolleret således, at sammensætningen af det udgåede materiale svarede til en konvertering på ca. 65%, d.v.s. 23% DOO i det sluttelige triglycerid (DOO betyder et triglycerid med en decansyreenhed (i ydre position) og to oliesyreenheder).

Under antagelse af, at aktivitetsreduktionen af den immobiliserede lipase følger en første ordens reaktion, kan halveringstiden bestemmes til 3200 timer. Med en initial aktivitet på 2,4 g triglycerid/time/g enzympræparat er produktiviteten ca. 8,3 tons triglycerid/kg enzympræparat under antagelse af en produktionstid svarende til to halveringstider. På fig. 1 er logaritmen af strømningshastigheden afbildet mod tiden.

Anvendelsesforsøg nr. 2

Man gennemførte samme anvendelsesforsøg som anvendelsesforsøg nr. 1, men ved 70°C i stedet for 60°C.

Det viste sig, at halveringstiden var 1300 timer, og 5 at den initiale aktivitet var 2,3 g triglycerid/time/g enzympræparat svarende til en produktivitet af 3,2 tons triglycerid/kg enzympræparat. Logaritmen af strømningstigheden er afbildet mod tiden på fig. 2.

Eksempel 14

10 Dette eksempel illustrerer, at det er muligt, at et immobiliseret lipasepræparat fremstillet ifølge opfindelsen kontinuerligt kan omestre en højtsmeltende triglyceridblanding bestående af oksetalg og sojabønneolie uden solvent eller andre hjælpestoffer. Lignende processer kan være anvendelige 15 til fremstilling af specielle fedtstoffer uden anvendelse af hydrogenering og kemisk omestring og velegnet til margarine eller dermed beslægtede produkter.

Immobilisering

19,8 g fugtig (86,0% tørstof) Duolite® A 561 ion- 20 bytter, hvor over 80% af partiklerne har en størrelse mellem 400 og 850 µm, blev indstillet på pH 6,0 i vandig suspension og vasket med vand. 50 ml Mucor miehei lipase (7400 LU/ml, 8% tørstof) blev blandet med ionbytteren, og pH blev genindstillet på 6,0. Efter omrøring i to timer ved stuetemperatur, 25 filtrering og vask med 2 x 50 ml vand blev præparatet tørret i vacuum ved stuetemperatur. Udbyttet var 19,2 g indeholdende 8,5% vand. Den aktivitet, som var tilbage i filtratet, var 34% af den totale, initiale mængde. Omestringsaktiviteten ved diskontinuerlig drift var 25,4% POO, 6,0% POO efter 1/2 times 30 drift eller 12,5% inkorporeret P.

Analyse af den omestrede reaktionsblanding

Man rekvirerede hvidt oksetalg og frisk raffineret sojabønneolie fra lokale markeder. Substratet bestod af 1,5 dele oksetalg og 1 del sojabønneolie, og blandingen foretoges 5 ved 70°C. Man tilsatte BHT-antioxidant i en koncentration af 0,1%. For at karakterisere de individuelle komponenter og for at følge omeststringsreaktionen anvendtes HPLC til analyse af triglyceridsammensætningen af substratkomponenterne, den initiale blanding og omeststringsblandingen. Man gennemførte 10 initialt en diskontinuerlig reaktion med 2,75 g immobiliseret *Mucor miehei* lipasepræparat, 24 g talg og 16 g sojabønneolie i 16,5 timer ved 65°C. HPLC viste, at forholdet mellem LPO- og LLL-triglycerid (L: linolsyre, P: palmitinsyre, O: oliesyre) i blandingen voksede fra 0,62 til 1,16, hvorved dette sidste tal 15 formentlig ligger tæt på ligevægtsforholdet.

Smelteegenskaber hos den omestrede blanding

Ændringen af smelteegenskaberne hidrørende fra omestringen blev analyseret ved dilatation i henhold til den officielle IUPAC-metode (IUPAC: standard methods for the 20 analysis of oil, fats, and derivatives, 6. udg., metode nr. 2.141 (1979)). Resultaterne fremgår af den følgende tabel, hvor en tilsvarende ikke-omestret blanding af oksetalg og sojabønneolie (1,5:1) er medtaget som reference.

Temperatur, °C		0	20	25	30	35	40	45
25	Ikke-omestret							
	Dilata- tion (µl/g 30 fedt)	blanding	30,8	22,9	18,7	14,6	11,2	6,5 1,6
	Omestret							
	blanding	16,5	4,9	4,9	3,1	0,6		

Forsøg i søjle

Et lille thermostatret søjlesystem blev sat under drift i to dage for at illustrere en kontinuerlig proces. 4,0 gram af det beskrevne immobiliserede lipasepræparat blev indført i en søjle. Man anvendte også en forkolonne indeholdende 5 gram fugtig Duolite® A 561 ionbytter (50% tørstof). Man tilførte kontinuerligt oksetalg/sojabønneolie i forholdet 1,5:1 w/w gennem søjlesystemet ved 67°C. Egenskaberne hos det immobiliserede lipasepræparat er vist i 10 den følgende tabel.

Prøve/tid	Strømnings-	Sammensætning	Konvertering
	hastighed g TG/h/g enz.	LPO/LLL	%
Substrat af			
15 talg/soja-			
bønneolie			
(18 timer)	-	0,65	6
Produkt			
efter 18 timer	2,10	0,90	52
20 Produkt			
efter 41 timer	1,63	0,93	54
Ligevægt			
(diskontinuer-			
lig drift)	-	1,16	100

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret lipasepræparat til omestring af fedtstoffer, kendetegnet ved, at man bringer en vandig opløsning af en mikrobiel lipase i kontakt med en partikelformet, makroporøs, svag anionbytter, der indeholder primære og/eller sekundære og/eller tertiære aminogruupper, og hvis partikler for mere end 90% af partiklernes vedkommende har en partikelstørrelse på mellem 100 og 1000 μm , fortrinsvis mellem ca. 200 og 400 μm , under betingelser, ved hvilke lipasen bindes til anionbytteren, i et tidsrum, der er tilstrækkeligt langt til at binde den ønskede lipasemængde til anionbytteren, hvorefter den således dannede immobiliserede lipase separeres fra den vandige fase og den separerede immobiliserede lipase tørres til et vandindhold på mellem ca. 2 og 40%.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at lipasen er en thermostabil lipase.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, kendetegnet ved, at den mikrobielle lipase er afledt af en thermophil Mucor-art især Mucor miehei.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 3, kendetegnet ved, at forholdet mellem mængden af den vandige opløsning af den mikrobielle lipase og vægten af svag anionbytter svarer til 5000 - 50.000 LU/g ionbytter (tørvægt).
5. Fremgangsmåde ifølge krav 3, kendetegnet ved, at pH under kontakten mellem ionbytteren og den vandige opløsning ligger mellem 5 og 7.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 5, kendetegnet ved, at kontakttiden er mellem 0,5 og 8 timer.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 6, kendetegnet ved, at separationen er en simpel filtrering.
8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, kendetegnet ved, at tørringen gennemføres til et vandindhold på mellem 5 og 20%.

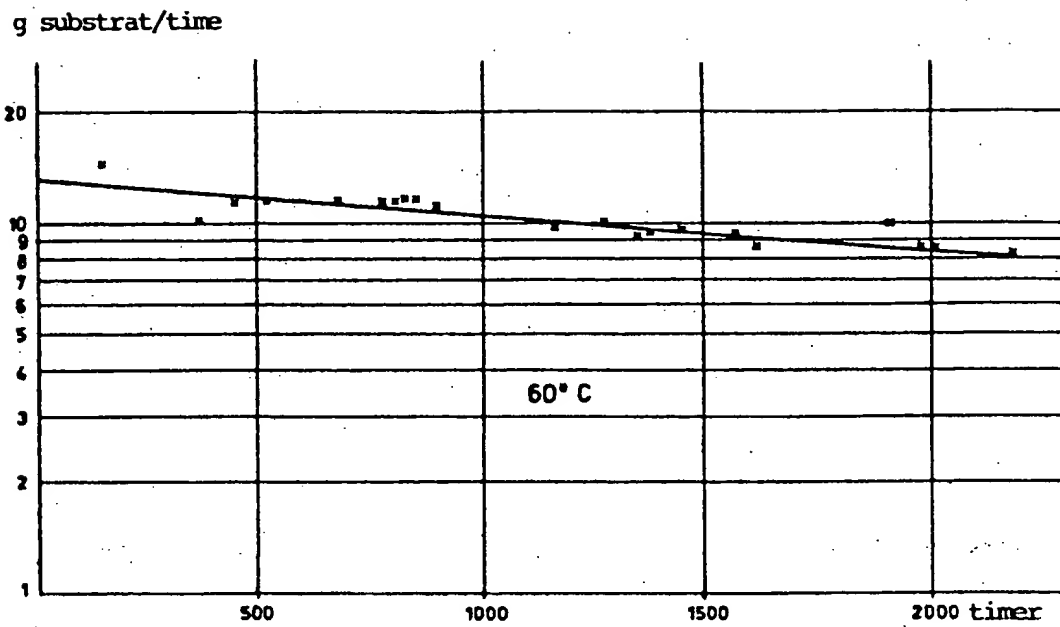


fig.1

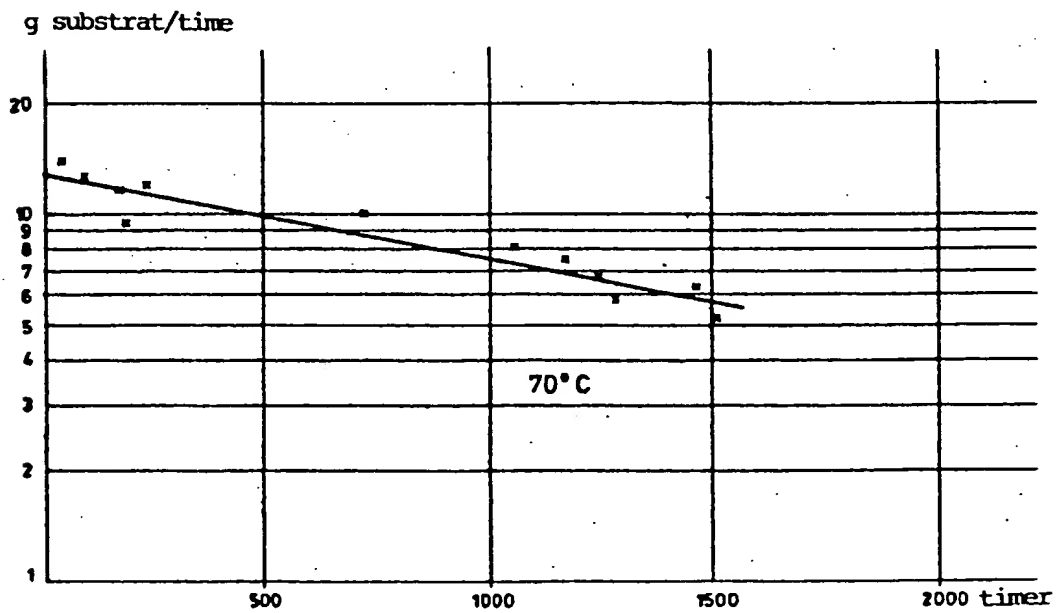


fig.2